

Application de la planification expérimentale et du design space pour la séparation des composés extraits des feuilles de *Strychnos usambarensis*

I. Nistor^{1,2}, B. Debrus¹, P. Lebrun¹, F. Lecomte¹, M. Cao³, M. Frederich³, L. Angenot³, B. Boulanger⁴, R. Oprean², Ph. Hubert¹

¹ Laboratoire de Chimie Analytique, CIRM, Université de Liège, LIEGE, Belgique

² Laboratoire de Chimie Analytique, Université de Médecine et Pharmacie 'Iuliu Hatieganu', CLUJ-NAPOCA, Roumanie

³ Laboratoire de Pharmacognosie, CIRM, Université de Liège, LIEGE, Belgique

⁴ R&D Clinical Pharmacometrics, UCB Pharma SA., BRUXELLES, Belgique

Le paludisme est l'une des infections parasitaires la plus fréquente. Elle représente un problème majeur dans le domaine de la santé publique à cause de la résistance du *Plasmodium falciparum* aux médicaments existants sur le marché. C'est pourquoi la découverte de nouvelles molécules à effet antipaludéen est un sujet de recherche d'importance capitale. La flore africaine reste un réservoir immense de molécules ayant un potentiel effet thérapeutique contre cette parasitose tropicale. Certaines molécules extraites de *Strychnos usambarensis* (principalement l'isostrychnopentamine) présentent en effet ces propriétés [1] et leur usage dans le traitement du paludisme pourrait être envisagé. De plus, plusieurs alcaloïdes tertiaires isolés de cette même espèce présentent également d'importantes propriétés cytotoxiques. L'isolement et la quantification de ces différents alcaloïdes est donc indispensable, notamment pour envisager leur exploration pharmacologique. Néanmoins, la complexité de la composition alcaloïdique des feuilles de *Strychnos usambarensis* rend très difficile la séparation des différents composés, de structures très proches.

Dans ce cas-ci, le problème principal de la séparation des composés est leur comportement chromatographique similaire ainsi que le nombre élevé de molécules co-extraites pouvant coéluer avec les pics d'intérêt. De plus, leur spectre UV-visible quasiment identique rend la détection et l'identification des pics délicate. Cette séparation a été réalisée au moyen de la chromatographie liquide d'appariement d'ions. Les paramètres régissant la séparation de ces molécules ont été optimisés par la planification expérimentale [2]. Les facteurs du plan expérimental factoriel complet sélectionnés sont le pourcentage de modificateur organique en début de gradient, le temps de gradient pour passer de ce pourcentage initial à 70% de modificateur organique et la proportion d'acétonitrile dans la phase mobile. Les temps de rétention des composés ont été modélisés par des équations linéaires multiples et ont permis le calcul et l'optimisation de la séparation (S) qui est définie comme la différence entre le temps au début d'un pic et le temps à la fin du pic précédent, pour la paire critique (pic les plus proches). Afin de pouvoir estimer la robustesse, la probabilité d'atteindre une séparation supérieure ou égale à zéro ($R_s \sim 1.5$) a été calculée au moyen de simulations de Monte Carlo. Il est alors possible de définir le design space de la procédure analytique développée qui est la zone dans laquelle cette probabilité est supérieure à un niveau de qualité prédéfini (par exemple 80%). Les conditions opératoires comprises dans le design space offriront des séparations répondant aux exigences fixées. Cette méthodologie d'optimisation a permis d'obtenir des conditions expérimentales optimales pour séparer les 6 composés d'intérêt.

[1] M. Frederich, M. Tits, L. Angenot, Potential antimalarial activity of indole alkaloids, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 102 (2008) 11-19

[2] P. Lebrun, B. Govaerts, B. Debrus, A. Ceccato, G. Caliaro, Ph. Hubert, B. Boulanger, Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods, Chemom. Intell. Lab. Syst., 91 (2008) 4-16